



MUSEO DE HISTORIA  
NATURAL DE VALPARAÍSO



# ANALES

del Museo de Historia Natural  
de Valparaíso (En línea)



# Ecología y Medio Ambiente

Dibujo naturalista *Codeguala tetra* sp., creado para ser parte de los fascículos coleccionables de la revista *Expedición a Chile* publicada por la Editora Nacional Gabriela Mistral, creada con el objetivo de dar a conocer el patrimonio natural y cultural de Chile.

Este dibujo es parte de un conjunto de 35 obras que se encuentran en comodato en el Museo de Historia Natural de Valparaíso, siendo resguardadas por la Biblioteca Científica John Juger. N° de registro LP050-30, colección de arte, fotografía y grabado, Biblioteca científica MHNV.

## Potencial uso y aplicaciones del ADN ambiental en humedales: una novedosa aproximación al estudio de la biodiversidad íctica en Chile

Lenka Kurte Palma\*

Francisco Llanquín-Rosas\*\*

Claudio Quezada-Romegialli\*\*\*

### RESUMEN

Chile en el continente Sudamericano está caracterizado por presentar una variedad de ecosistemas acuáticos que han sido moldeados de acuerdo a los patrones bioclimáticos y biogeográficos imperantes, en la que se ha desarrollado una fauna única y altamente endémica. En este contexto, y considerando los compromisos ambientales y de conservación de especies y ecosistemas del Estado de Chile, realizamos una revisión del potencial uso y aplicaciones del ADN ambiental en humedales como una técnica complementaria para estudios de biodiversidad en Chile y

planteamos una serie de hipótesis que son útiles para comprender la ecología del ADN ambiental en Chile. Además, realizamos una prueba experimental del efecto de diferentes métodos de extracción de ADN ambiental y evaluamos el éxito de amplificación en dos humedales de la Ecorregión de Lagos Valdivianos. Encontramos que existen diferencias en la concentración de ADN entre los métodos, pero que están asociadas al método de cuantificación (fluorimétrica vs espectrométrica). Sin embargo, el éxito de amplificación puede depender del método de

\* Biotecnóloga, Mg(c) en Cs. m. Biodiversidad y Conservación, Laboratorio de Limnoecología, Universidad de Playa Ancha, Valparaíso & Núcleo Milenio INVASAL, Concepción. lenkakurte@gmail.com

\*\* Biólogo Ambiental, Mg(c) en Cs. Biológicas, Laboratorio de Limnoecología, Universidad de Playa Ancha, Valparaíso & Núcleo Milenio INVASAL, Concepción. francisco.llanquin@ug.uchile.cl

\*\*\* Ingeniero Ambiental, Dr. en Cs. m. Ecología y Biología Evolutiva, Laboratorio de Limnoecología, Universidad de Playa Ancha, Valparaíso; Núcleo Milenio INVASAL, Concepción; AquaGenetix, Valparaíso. claudio.quezada@upla.cl

extracción de ADN ambiental. Finalmente, concluimos que el uso del ADN ambiental es una alternativa atractiva y factible de ser utilizada en complemento a las metodologías tradicionales de muestreo.

**Palabras claves:** ecosistemas acuáticos, peces, eDNA, análisis molecular.

## ABSTRACT

In South America, Chile is characterized by presenting a variety of aquatic ecosystems that have been shaped according to the prevailing bioclimatic and biogeographic patterns, in which a unique and highly endemic fauna has developed. In this context, and considering the environmental and conservation commitments of species and ecosystems of the State of Chile, we carry out a review of the potential use and applications of environmental DNA in wetlands as a complementary technique for biodiversity studies in Chile and we propose a series of hypotheses that are useful for understanding the ecology of environmental DNA in Chile. Furthermore, we conducted an experimental test of the effect of different environmental DNA extraction methods and evaluated the amplification success in two wetlands of the Valdivian Lakes Ecoregion. We found that there are differences in DNA concentration between the methods, but that they are associated with the quantification method (fluorimetric vs. spectrometric). However, the success of amplification may depend on the environmental DNA extraction method. Finally, we conclude that the use of environmental DNA is an attractive and feasible alternative to be used in addition to traditional sampling methodologies.

**Keywords:** aquatic ecosystems, fish, eDNA, molecular analysis.

## INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas acuáticos continentales se caracterizan por tener una heterogénea productividad en el perfil longitudinal y por ofrecer una variedad de tipos de hábitats que permiten el desarrollo de un gran número de especies (Vila, et al. 2006), de forma tal que sostienen una alta riqueza y biodiversidad. Estos ecosistemas, o humedales según la definición propuesta por la Convención de Ramsar (2013), son de vital importancia debido a que mantienen procesos ecológicos claves en el que las especies interactúan y las comunidades fluctúan y evolucionan en el espacio y tiempo (Elosegi y Sabater, 2009). La extensa franja continental que Chile presenta en Sudamérica le confiere una amplia diversidad bioclimática, con variados paisajes, ecosistemas y ambientes acuáticos que se distribuyen a lo largo de un marcado gradiente latitudinal distribuyéndose en cinco ecoregiones que coinciden con los patrones climáticos y geográficos (Figura 1) (Abell, et al. 2008; Luebert y Plissock, 2017).

### Características de las aguas continentales en Chile

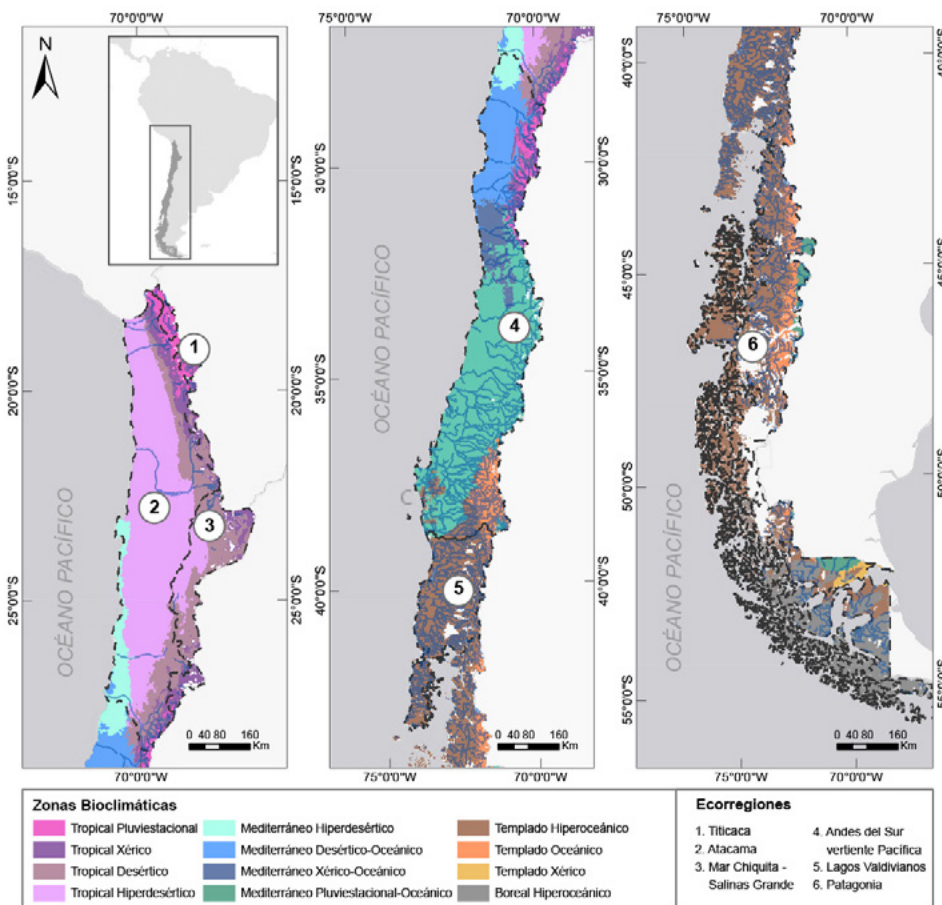
En Chile existen más de 20 tipos de humedales (Gligo, 2016; MMA, 2019), influenciados por el aislamiento biogeográfico y las barreras naturales del Océano Pacífico y la Cordillera de Los Andes, incluyendo ríos, planicies de inundación, lagos, lagunas, bofedales, hualves, turberas, estuarios y áreas costeras marinas, con una importante diversidad biológica y genética, con un alto y marcado endemismo (Vila y Quezada-Romegialli, 2018). En el extremo norte, la zona Altiplánica presenta cuencas endorreicas con humedales principalmente de tipo bofedal, lagunas, ríos intermitentes y salares. Hacia la zona central (entre los 27° y 31° Latitud Sur),

las condiciones climáticas y geográficas cambian, las cuencas son de carácter exorreico (desembocan en el mar), aparecen sistemas acuáticos de valles transversales y cuerpos de aguas temporales. A partir de los 31° LS las precipitaciones y la densidad de humedales aumentan, se observan ríos de mayores caudales, y paulatinamente los paisajes incluyen fiordos, hualves, grandes lagos, marismas y turberas. Por último, en la zona sur-austral se registran las mayores precipitaciones del país, concentrándose a su vez la mayoría de los recursos hídricos, destacan lagos de gran envergadura y ríos medianamente extensos que alimentan una gran cantidad de fiordos y canales (Figuroa, 2018; Reid, et al. 2019).

Esta heterogeneidad de ambientes únicos en el mundo configura un escenario ideal para el desarrollo de una biodiversidad característica, en la que han evolucionado alrededor de 31.099

especies nativas considerando mamíferos, aves, peces e invertebrados (MMA, 2016). En particular, se han descrito 1.226 especies de peces marinos y alrededor de 48 especies de peces continentales y estuarinos (Vila y Quezada-Romegialli, 2018; Habit, et al. 2019).

Ante este escenario, el estudio de la diversidad genética (biodiversidad a nivel intraespecífico) comenzó a tomar mayor relevancia ecológica a partir del año 2000, actualmente los peces y anfibios son los grupos mejor estudiados (Habit, et al. 2019). Sin embargo, pese al aumento de los trabajos realizados en diversidad genética en los últimos años, la información total disponible sigue siendo insuficiente, ya que no logra cuantificar de forma apropiada la diversidad intraespecífica de la biota presente en Chile (MMA, 2018), especialmente los peces de aguas continentales (Vila y Quezada-Romegialli, 2018).



**Figura 1:** Ecorregiones biogeográficas de Chile de acuerdo a Abell, et al. (2008), considerando los patrones bioclimáticos de Luebert y Plissock (2017).

## Compromisos ambientales y estado de conservación de las especies en Chile

### 1) Compromisos

En la cumbre de la Tierra por las Naciones Unidas de Río de Janeiro en 1992, se reconoció la necesidad mundial de conciliar la preservación y conservación futura de la biodiversidad, a través del Convenio sobre la Diversidad Biológica (CBD) que Chile oficializó en 1995. Luego en el año 2003, Chile estableció un plan estratégico 2011-2020 y desafíos para la conservación de la biodiversidad con el fin de lograr los objetivos comprometidos en el CBD, planteando cinco líneas estratégicas: 1) Promover el uso sostenible de la diversidad biológica; 2) incrementar la conciencia, participación, información y conocimiento sobre la biodiversidad; 3) establecer instituciones sólidas, buena gobernanza y distribución equitativa de los beneficios derivados de la diversidad biológica; 4) incluir objetivos de la biodiversidad en políticas, planes y programas del sector público y privado; y 5) proteger y restaurar la biodiversidad y sus servicios ecosistémicos; dividiendo el plan en cinco áreas temáticas (conservación de la biodiversidad de las islas marinas y oceánicas, manejo de las especies exóticas invasoras, conservación de especies autóctonas, áreas protegidas, y conservación y uso racional de humedales (Jorquera-Jaramillo, et al. 2012; Gligo, 2016).

Sin embargo, el quinto informe de evaluación del avance en el cumplimiento de la CBD (MMA, 2014), concluye que el 85% de las 20 metas para la preservación y conservación de la biodiversidad, establecidas en el Plan Estratégico para la Diversidad Biológica 2011-2020, poseen cumplimiento de grado bajo y medio-bajo, y ninguna meta ha sido cumplida con un nivel alto (Gligo, 2016; 2019). Adicionalmente, el último informe, no presenta resultados alentadores, en donde metas tales como la incorporación de elemen-

tos para la reducción de los impactos sobre la biodiversidad y establecimiento de criterios para la conservación; monitoreo, seguimiento, evaluación y reporte de la salud de la biodiversidad en todos sus niveles, y un avance hacia la regulación que resguarde los recursos genéticos nativos, siguen presentando avances insuficientes o sin cambios. (MMA, 2016; 2019).

### 2) Conservación y biodiversidad

No se puede proteger lo que no se conoce, por lo tanto, los problemas de la descripción de la biodiversidad juegan un rol importante al momento de tomar decisiones sobre conservación. Estas dificultades están ligadas principalmente a la identificación de individuos en sus primeros estadios de desarrollo (Peredo-Parada, et al. 2009), y la identificación de especies crípticas, aquellas raras o difíciles de capturar que muchas veces requieren de taxónomos expertos y/o esfuerzos de muestreo rigurosos y constantes, haciendo que las evaluaciones ambientales a gran escala sean costosas, lentas y poco representativas, sin contar con los posibles peligros que se puede someter el investigador y los daños que se pueden generar a los individuos o ecosistemas en estudio (Bista, et al. 2017; Cristecu y Hebert, 2018; Adams, et al. 2019). Por otro lado, es importante conservar la biodiversidad en todos sus niveles jerárquicos, esto es a nivel de paisaje, ecosistemas, comunidades, especies y poblaciones, y genes. En particular, la diversidad genética es un factor determinante para estimar la biodiversidad en humedales, ya que nos permite comprender de mejor forma las interacciones entre especies y su ambiente como herramienta para preservar la diversidad biológica, y evaluar el estado de los sistemas de agua dulces, monitoreando posibles factores de estrés que pueden conllevar a una pérdida de

biodiversidad (Habit, et al. 2019). Las principales razones que afectan la diversidad del país, y específicamente que atañen a la ictiofauna, se encuentran la fragmentación y alteración de ecosistemas terrestres que lleva consigo a aumentos en la contaminación acuática, sobreexplotación del recurso hídrico por uso industrial, ganadero y humano, el cambio climático y la introducción de especies invasoras (Butchart, et al. 2010; Caley, et al. 2014; Johnson, et al. 2017; Habit, et al. 2019), que potenciados con una débil gestión sobre la diversidad biológica, deja en evidencia un importante déficit en la aplicación de políticas públicas, escasez de fondos disponibles, limitada información e insuficiente preocupación por el medio ambiente por parte de las entidades correspondientes (Pérez-Quezada y Rodrigo, 2018). Además, una aparente insuficiencia en el diagnóstico temprano sobre el estado del medio ambiente, pone en peligro los ecosistemas únicos en el mundo que nuestro país posee. Para detener la pérdida de especies y/o hacer seguimiento a especies que se encuentren en alguna categoría de conservación, resulta necesaria la aplicación de métodos novedosos, más robustos, confiables y económicos, que complementen las técnicas tradicionales para la descripción de la fauna que habita en los humedales. Dentro de este contexto, en el presente trabajo realizamos una revisión del potencial uso y aplicaciones del ADN ambiental en humedales como una técnica complementaria para estudios de biodiversidad íctica en Chile. Adicionalmente, realizamos una prueba experimental del efecto de diferentes métodos de extracción de ADN ambiental y el éxito de amplificación en dos humedales con alta presencia de inhibidores en la Ecorregión de Lagos Valdivianos, como primer paso para el uso del ADN ambiental en estudios de monitoreo ambiental pilotos.

## Uso y obtención del ADN ambiental

La utilización del material genético proveniente de células cutáneas, orina, heces, saliva o cualquier secreción o tejido corporal, incluso cadáveres, que los individuos desprenden al ambiente (i.e. ADN ambiental, eDNA por sus siglas en inglés environmental DNA), puede adherirse o ser depositado en el sedimento, zona inferior o lateral en humedales, o bien permanecer o ser transportado en la columna de agua (Barnes y Turner, 2016; Elbrecht y Leese, 2017; Adams, et al. 2019). Así, el uso del eDNA se ha establecido como una alternativa complementaria a las técnicas de monitoreo tradicionales, suministrando información rápida y a gran escala sobre la genética, minimizando así el estrés en animales silvestres, soslayando la escasez de taxónomos especializados (Cristecu y Hebert, 2018; Adams, et al. 2019). La captura del eDNA se puede realizar a través de diferentes metodologías como, por ejemplo, filtración de agua, concentración de ADN proveniente de distintas matrices o extracción de ADN desde muestras de sedimento (Cristecu y Herbert, 2018), basándose principalmente en la detección de fragmentos cortos de ADN, preferentemente de ADN mitocondrial (ADNmt), debido a su gran número de copias, el que actúa como un marcador molecular único (Rees, et al. 2014).

### 1) Técnicas de estudio, análisis y aplicaciones del eDNA

El avance, accesibilidad y sensibilidad de las tecnologías moleculares para los análisis del ADN han abierto nuevas aristas en diferentes técnicas que pueden ser utilizadas para monitoreos ecosistémicos usando eDNA (Cristecu y Hebert, 2018; Harper, et al. 2018). Es así como en estudios de genética de poblaciones y diversidad genética, los análisis de PCR-RFLP (por sus

siglas en inglés, restriction fragment length polymorphism PCR) son ampliamente usados ya que permite la detección de polimorfismos en las secuencias del ADN a través de la utilización de enzimas de restricción, resultando en una alternativa económica y altamente sensible, sin embargo, no tan precisa (Clusa, et al. 2017; Igawa, et al. 2019). Por otro lado, los análisis de metabarcoding (en español literalmente meta-barcódigo o “meta código de barras genético”) se refieren a la detección simultánea de múltiples especies dentro de una comunidad, a través de la amplificación de secuencias de ADNmt por PCR (por sus sigla en inglés polymerase chain reaction) con partidores grupo-específicos, entregándonos información más precisa sobre la riqueza de un taxa en específico (Bálint, et al. 2018; Nester, et al. 2020). Por otro lado, a través del eDNA, podemos obtener una estimación directa de la cantidad absoluta de un gen en una muestra ambiental, y por lo tanto, una estimación indirecta de la abundancia o biomasa de una especie en el sitio de estudio (Itakura, et al. 2019). Los análisis de qPCR (reacciones en cadena de la polimerasa cuantitativo o en tiempo real, qPCR por sus siglas en inglés quantitative PCR) nos entrega información sobre la presencia/ausencia de un trozo de un gen especie-específico, el que además cuantifica su número de copias en tiempo real en una muestra de eDNA (Harper, et al. 2018; Itakura, et al. 2019). A pesar de estos importantes avances, en los últimos años se ha desarrollado la técnica de ddPCR (por sus siglas en inglés droplet-digital PCR), siendo aún más sensible que el qPCR, que permite la detección y cuantificación de concentraciones bajas de ADN, ya que realiza un fraccionamiento de la reacción de PCR en más de 20.000 gotas utilizando aceite de emulsión, incorpora una tinción fluorescente directamente en la reacción, similar a la técnica de citometría de flujo, realizando un conteo independiente de controles positivos y

negativos, lo que disminuye la posibilidad de obtención de resultados erróneos (Baker, et al. 2018; Hunter, et al. 2019). Estos análisis de eDNA han sido ampliamente utilizados como un método validado para la detección y cuantificación de especies en diferentes ecosistemas, permitiendo realizar estudios ecológicos a diferentes escalas temporales y espaciales, capturando patrones de biodiversidad, validando la riqueza de taxones y la composición de las comunidades (Harper, et al. 2019; Hansen, et al. 2020), a través de diferentes aplicaciones.

### **1.1) El ADN ambiental como herramienta de gestión**

Para estudios de sistemas acuáticos, se han propuestos diversos índices bióticos y especies como indicadores biológicos para evaluar el estado y/o calidad del agua en ecosistemas acuáticos (Figuroa, et al. 2007; Habit, et al. 2019). De acuerdo con lo comprometido en el Plan de Adaptación al Cambio Climático en Biodiversidad (MMA, 2014), se planteó como estrategia crear una red nacional de monitoreo de la biodiversidad a nivel de cuencas y microcuencas como indicadores de salud ambiental de ecosistemas acuáticos, requiriendo un esfuerzo de integración y coordinación entre distintos actores (consultores, académicos, investigadores y otros) que levantan información pública a través de tres actividades: 1) Sistema de Evaluación Ambiental (SEIA); 2) Programas de seguimiento establecidos en Resoluciones de Calificación Ambiental (RCA), y 3) Normas de Calidad Secundaria del Agua (NSCA). El eDNA se perfila como una novedosa alternativa de biomonitoreo (Figura 2), utilizando técnicas moleculares (e.g. metabarcoding) que permite extender el número de especies detectadas y aumentar la resolución taxonómica, mejorando la



caracterización del ensamble de especies en las comunidades ecológicas (Hering, et al. 2018), y que resulta complejo de realizar sólo con claves taxonómicas. De esta manera, la identificación en base a ADN posibilita incluir especies poco frecuentes o difíciles de observar con métodos tradicionales, así el monitoreo de especies invasoras, endémicas o en peligro de extinción se ve beneficiado. A modo general, los métodos moleculares permitirían establecer métricas o índices moleculares proporcionando conclusiones similares y complementarias a los métodos tradicionales, sobre las condiciones ambientales, el estado y la ecología en sistemas acuáticos (Pawlowski, et al. 2018). La estandarización de los métodos de análisis genéticos, junto con la sistematización de la información proporcionarán a los actores una herramienta útil y eficaz para apoyar a la red nacional de monitoreo.

## 1.2) Experimentación y aspectos claves

Con el objetivo de comprender los procesos ecológicos que operan en los ecosistemas acuáticos, como también en estudios descriptivos para dilucidar los patrones de riqueza y abundancia en peces y otros grupos, se pueden realizar diversos experimentos en base al eDNA (Bista et al., 2017; Itakura et al., 2019). Por ejemplo, en el trabajo de Evans et al. (2016) se plantean una serie de preguntas: ¿Es posible medir la riqueza de especies ícticas utilizando eDNA metabarcoding dentro de una comunidad de especies en diferentes densidades y abundancia relativa?; ¿Existe una asociación positiva entre la abundancia de especies ícticas y la secuenciación masiva?; ¿Qué aproximación es más certera en predecir abundancia, el número de individuos o la biomasa?. Para responder a estas interrogantes se puede plan-

tear tres tipos de diseños experimentales, a diferentes escalas espaciales y temporales (Figura 2):

- **Experimentos de campo:**

Se utilizan arroyos naturales y/o artificiales, estos últimos ofrecen la capacidad de control de algunas condiciones ambientales (velocidad de corriente, nivel del agua, concentración de sustancias químicas). Presentan un alto realismo, permite comprender patrones a pequeña (riqueza y abundancia) y gran escala (distribución) para estudiar comunidades o poblaciones ícticas en condiciones naturales. También permiten evaluar el efecto del cambio climático en la diversidad genética.

- **Experimentos de mesocosmos:**

Se aíslan comunidades de organismos acuáticos de su ambiente natural, se someten a experimentación procesos ecológicos que controlan las comunidades acuáticas (e.g. efecto Top-Down, Bottom-Up), perturbaciones, interacciones tróficas y patrones de colonización, entre otros.

- **Experimentos de laboratorio:**

Se aíslan individuos de poblaciones acuáticas de su ambiente natural, se pueden estudiar aspectos de la persistencia del ADN de la especie de interés, como también la variación de la concentración de eDNA frente a factores controlados (e.g. exposición a luz y sombra, concentración de sustancias químicas, temperatura, luz ultravioleta, entre otros).

Por otro lado, en la parte experimental está implícito que la comprensión de los aspectos claves respecto a la ecología del eDNA considera principalmente cuatro aristas, el origen, estado, transporte y persistencia del

material genético en el medio ambiente (Barnes y Turner, 2016).

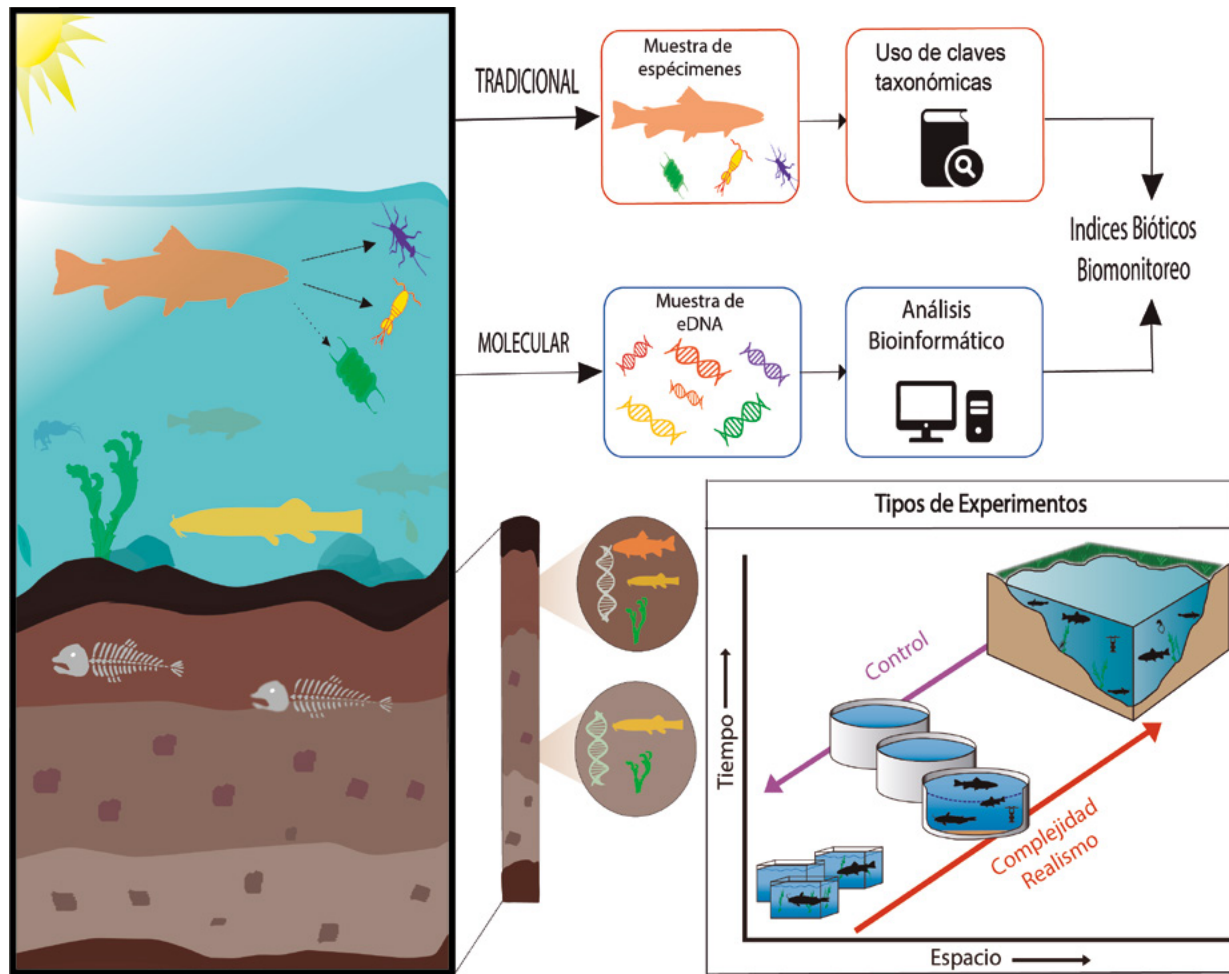
### 1.3) Especies invasoras

Las especies exóticas invasoras (EEI) en ecosistemas de agua dulce de Chile son numerosas y diversas, incluyendo microalgas, macrófitas, peces, anfibios y mamíferos, entre otros (Habit, et al. 2019). Los salmónidos son posiblemente el grupo de especies invasoras más exitosas y que probablemente generan un mayor impacto a los ecosistemas (Arismendi, et al. 2014). Debido al carácter de oportunistas y ser depredadores de gran tamaño, generalmente afectan a las poblaciones nativas, con efectos adversos en los diferentes niveles ecológicos, generando importantes pérdidas de biodiversidad (Mouillet, et al. 2018). Los estudios de eDNA han sido ampliamente usados para la detección y monitoreo de las EEI, en sistemas de agua dulce y otros ecosistemas (Barnes y Turner, 2016; Dougherty, et al. 2016), debido principalmente a la rapidez en la entrega de resultados (Figura 2). La detección temprana de especies invasoras es primordial para evitar daños mayores, o su expansión a otros ecosistemas, pudiendo utilizar las diferentes aplicaciones del eDNA para el monitoreo de EEI, permitiendo obtener información más precisa sobre los impactos producidos en los distintos niveles de la trama trófica, evaluar el contenido de las aguas de lastre, entre otros.

### 1.4) ADN ancestral

La paleobiología se ha posicionado en los últimos años como una alternativa de monitoreo ambiental, combinando disciplinas como la paleontología, la biología y la ecología, con

el fin de entender los acontecimientos del pasado, y tomar mejores decisiones para el futuro (Bálint, et al. 2018). La paleogenómica es una de las ramas de la paleobiología que utiliza el ADN antiguo o ancestral (ADNa), el cual se define como ADN degradado que ha perdurado al paso de los años, para ofrecer, una ventana al pasado (Shapiro, et al. 2012). El análisis de ADNa permite, registrar cambios genéticos a través del tiempo y observar directamente procesos evolutivos y ecológicos (Shapiro, et al. 2012; Orlando y Cooper, 2014). Dentro de este contexto, los sedimentos de lagos y lagunas se han posicionado como excelentes archivadores de la historia evolutiva molecular de micro y macro-organismos acuáticos y terrestres, debido a las bajas perturbaciones que pueden presentar los sedimentos a través del tiempo (Parducci, et al. 2017; Ficetola, et al. 2018; Olajos, et al. 2018). Además, actualmente existe una alta capacidad de obtener información en un contexto temporal y espacial de las diferentes especies que habitaron allí en el pasado, gracias a la extracción del material genético que ha quedado adherido al sedimento (ADNseda, ADNa sedimentario) y al desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciación (Figura 2) (Olajos, et al. 2018). Chile posee ecosistemas altamente biodiversos y únicos en el mundo, que han sido, fuertemente alterados por cambios ambientales climáticos y no climáticos. Sin embargo, no existen registros extensos de las condiciones pasadas de estos ecosistemas y de sus cambios a través del tiempo, así como tampoco se tiene un buen entendimiento sobre el impacto ecológico y ambiental de la introducción de especies invasoras. No obstante, actualmente estas interrogantes pueden ser abordadas con mayor resolución con el uso de ADNa.



**Figura 2:** Esquema que ejemplifica diferentes aplicaciones y uso del eDNA. En la parte superior izquierda de la figura se observa el impacto que puede generar una especie acuática invasora (EEI; en este caso una silueta de Trucha arcoiris), las flechas segmentadas representan efectos negativos (en zooplancton y zoobentos) y la flecha punteada, posibles efectos positivos (en fitoplancton). En la parte superior derecha de la figura se representan diferentes metodologías de monitoreo (tradicional y molecular). En la parte inferior izquierda se esquematiza la obtención de un perfil sedimentario a través de un testigo o "core" para los estudios de ADN ancestral; y a la derecha abajo se representan distintos tipos de experimentación con el ADN ambiental con aspectos claves a diferentes escalas espaciales y temporales (Modificado de Petersen, et al. 2009).

## 2) Consideraciones respecto a la ecología del eDNA

En general el eDNA se presenta en distintos grados de fragmentación que están directamente relacionadas a las condiciones biológicas y ecológicas del sitio de estudio (Nester, et al. 2020), ya que se enfrenta de inmediato a procesos de degradación al ser liberado al medio, producidos principalmente por factores abióticos (e.g.

radiación UV, velocidad y turbulencia del agua, temperatura, pH, entre otros) y bióticos (e.g. la actividad enzimática y microbiana presente), lo que puede influir en su detección (Harper, et al. 2018; Cilleros, et al. 2019), al igual que las características propias de los individuos como la edad, los hábitos de alimentación, el tamaño

corporal y la ocupación de hábitat (Stat, et al. 2019; Nester, et al. 2020). Más aún, es necesario considerar el traslado del ADN por el ambiente, su posible adsorción al material particulado, donde diversos investigadores han observado un transporte a kilómetros de distancia desde su origen, y la dinámica de fuente-sumidero, es decir, la acumulación del ADN en diferentes sectores de las pozas y rápidos en ambientes lóticos, o bien, en el perfil de profundidad o de temperatura en ambientes lénticos (Barnes y Turner, 2016; Antognazza, et al. 2019; Nester, et al. 2020). Chile podría posicionarse como un potencial laboratorio natural para poner a prueba distintos protocolos para el uso y detección del eDNA, debido a la heterogeneidad de ambientes contrastantes que se encuentran distribuidos a lo largo del gradiente latitudinal de nuestro país, permitiendo identificar a priori los posibles factores bióticos y abióticos que podrían influir en la detección y persistencia del material genético en ecosistemas acuáticos. En este contexto, en las diferentes ecorregiones (Figura 1), planteamos las siguientes hipótesis sobre el posible estado del eDNA, de acuerdo con las características ambientales al momento de realizar un monitoreo ambiental a través del eDNA en Chile:

- Las ecorregiones de Titicaca, Atacama y Mar Chiquita–Salinas Grande presentan uno de los mayores niveles de radiación UV a nivel mundial, fuertes variaciones diarias de temperatura, y cambios en la calidad del agua debido a las fuertes precipitaciones concentradas en época estival. Además, existen salares y vertientes que alimentan los espejos de agua, presentando altas concentración de sales y metales pesados, condiciones extremas que disminuyen la abundancia y riqueza de especies. Todas estas características (i) podrían influir en la detección y/o temprana degradación del eDNA, y (ii) podrían interferir en los ensayos moleculares posteriores mediante la presencia de inhibidores inorgánicos. Además, el marcado endemismo en estas ecorregiones (iii) implicaría que los partidores utilizados en metabarcoding posiblemente no sean adecuados, necesitando el desarrollo de nuevos partidores para uso local.
- En la zona norte de la ecorregión de los Andes del Sur existen cuerpos de aguas temporales regulados por estacionalidad anual (régimen pluvio-nival característica de zonas mediterráneas secas y secano costero), como también por efectos antropogénicos. Los deshielos en época primaveral aumentan de manera significativa la turbidez de las aguas corrientes. Por lo tanto, (iv) el eDNA tendría tiempos de residencia más cortos comparativamente a otras zonas bioclimáticas, (v) debido a las altas cantidades de material disuelto y particulado los filtros se colmatarían tempranamente, y (vi) existirían diferencias temporales en la relación densidad de organismos vs eDNA.
- Desde la cuenca del río Bío Bío hacia el sur de la ecorregión Andes del Sur se presentan humedales oligotróficos, de baja conductividad y con poca carga de materia orgánica especialmente en las cabeceras de los ríos, (vii) lo que afectaría la permanencia del eDNA en el ambiente. Además, la riqueza y diversidad de especies ícticas aumenta hasta el máximo en esta zona, (ix) lo que podría requerir del desarrollo de partidores grupo-específicos para uso local.
- La ecorregión de Lagos Valdivianos se caracteriza por la presencia de ecosistemas lacustres que regulan el caudal de los ríos, y producto de las altas lluvias e importante desarrollo de vegetación, (x) la alta presen-

cia de compuestos húmicos y similares afectan el desempeño de los métodos moleculares basados en eDNA; (xi) mismo patrón que se debiera observar en los humedales de la Isla de Chiloé.

- Finalmente, en la zona Sur–Austral contenida por la ecorregión de la Patagonia, aumentan considerablemente las precipitaciones, los ríos presentan alto caudal y tramos cortos que desembocan en fiordos, lo que podría influir en la densidad del material genético, (xii) necesitando mayores volúmenes de agua para obtener similares cantidades de eDNA respecto a otras zonas en Chile; además, (xiii) el ecotono estuarino pudiese producir falsos positivos si existe resuspensión importante de sedimentos.

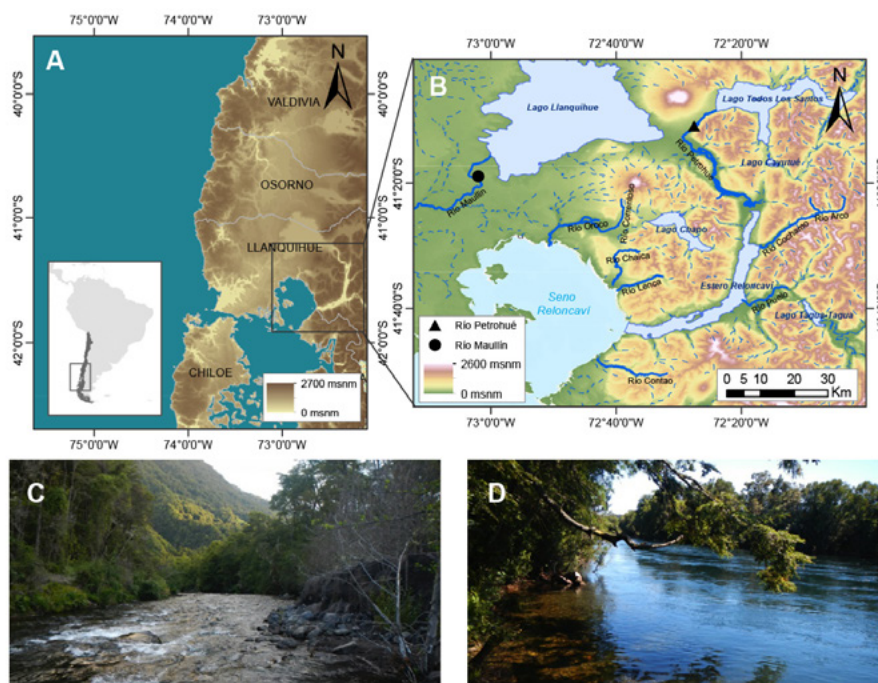
De este modo, la ecología del eDNA está ligada directamente con el sitio de estudio y con la especie objetivo, lo que presenta distintos grados de dificultad para su obtención y procesamiento (Harrison, et al. 2019), sin embargo, genera datos más claros, rápidos de obtener y más representativos, permitiendo tomar mejores deci-

siones respecto a la preservación y conservación de la biodiversidad, y por consiguiente, la sustentabilidad y estabilidad de los procesos ecológicos de los ecosistemas en constante cambio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Toma de muestras

Para comprobar la efectividad de las técnicas de detección de eDNA en sistemas acuáticos locales, se procedió a muestrear 2 sistemas fluviales con características distintas ubicados en la ecorregión de los Lagos Valdivianos: el río Maullín y el río Petrohué ( $41^{\circ}19'43''\text{S}$   $73^{\circ}2'4''\text{O}$ ; y  $41^{\circ}10'50''\text{S}$   $72^{\circ}27'33''$ , respectivamente). El río Maullín nace en el lago Llanquihue y posee un régimen de alimentación netamente pluvial con regulación lacustre, alcanza una longitud de 85 Km y desemboca sus aguas en el océano Pacífico. El río Petrohué, en tanto, corresponde al efluente del lago Todos los Santos, presenta igualmente un régimen de alimentación pluvial con regulación lacustre y aporte de aguas de deshielo, presenta zonas de rápidos en la parte superior del curso, y abarca una longitud de 36 Km para luego desembocar en el estero de Reloncaví (Figura 3).



**Figura 3:**

**A,** Panorama general de los sistemas en la Ecorregión de los Lagos Valdivianos. **B,** Visión general de los cuerpos de agua distribuidos en la zona de estudio y los sitios de muestreo, río Petrohué y río Maullín (indicado con triángulo y círculo, respectivamente). **C,** Río Petrohué con mirada aguas abajo del punto de muestreo, con presencia de rápidos. **D,** Río Maullín con vista aguas arriba del punto de muestreo.

En cada uno de los humedales se filtró 1000 mL de agua en los distintos sitios en sextuplicado, utilizando una bomba peristáltica portátil Alexis® (Pegasus) con batería y filtros estériles Nalgene (ThermoFisher) de nitrato de celulosa de 0.45 µm. Cada réplica se almacenó en buffer Longmire (Longmire, et al. 1997) el cual mantiene íntegro el ADN a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

### Extracción y purificación eDNA

Los trabajos con eDNA deben ser realizados en laboratorios especializados e independientes para su extracción, para evitar contaminaciones cruzadas entre las muestras, por ello las muestras fueron subdivididas y trabajadas de forma independiente por sitio. La extracción de ADN se llevó a cabo en el laboratorio de Limnoecología de la Universidad de Playa Ancha. Se realizó siguiendo el método de Fenol-Cloroformo-Isopropil II (PCIo2; Deiner, et al. 2018) y un kit comercial (kit Fast DNA Spin, MP Biomedicals), con el objetivo de evaluar y seleccionar el método de extracción más óptimo, dependiendo del sitio de muestreo. Además, se agregó un tercer tratamiento a las muestras utilizando un proceso de purificación del ADN removiendo inhibidores, mediante el kit comercial One Step PCR Inhibitor Removal (Zymo Research). Las extracciones de ADN se realizaron en tandas por sitio y por método, agregando un control de extracción con agua ultrapura como blanco. Para los kits comerciales se siguieron las recomendaciones del fabricante, mientras que para el método PCIo2 se siguió las indicaciones de Deiner, et al. (2018). Brevemente, se utilizaron tubos eppendorf de 2 mL con los filtros, 700 µL de buffer y 24 µL de proteinasa K (20 mg/mL) para digerir durante la noche a 55 °C. Se prepararon nuevos tubos de 2 mL con 27 mm<sup>3</sup> aprox. de grasa High Vacuum (Dow Corning) y se les aplicó luz UV por 30 minutos. Se realizó un vór-

tex a las muestras lisadas y se transfirió 550 µL del sobrenadante a los nuevos tubos con grasa, agregando 550 µL de fenol-cloroformo-isoamil a cada tubo, agitando vigorosamente por 5 minutos. Posteriormente se centrifugaron las muestras por 5 minutos a 10.000 RPM y se agregaron 550 µL de cloroformo-isoamil, agitando nuevamente por 5 minutos, y centrifugando otros 5 minutos a 10.000 RPM. Se traspasó el sobrenadante a nuevos tubos, agregando 44 µL de NaCl 5M, 1100 µL de EtOH 100 % y se mantuvo durante la noche a 4°C. Al día siguiente se centrifugaron las muestras a 10.000 RPM por 30 minutos, se descartó el alcohol, se agregó EtOH 70 %, centrifugando nuevamente por 30 minutos a 10.000 RPM y se descartó el alcohol. Las muestras se dejaron evaporar a temperatura ambiente por 24 horas, re-suspendiendo el ADN en 75 µL de agua ultrapura, re-disolviendo las muestras a 55 °C por 10 minutos y manteniendo las muestras hasta análisis a -20 °C.

Para evaluar la eficiencia de cada método de extracción, se cuantificó la concentración de eDNA obtenido en cada procedimiento mediante dos técnicas. La primera de ella fue por fluorometría a través del equipo Qubit 2.0 (Invitrogen, Thermofisher) que consiste en la utilización de fluoróforos específicos que se unen a la doble hebra de ADN (Qubit dsDNA HS Assay Kit) y el segundo fue por espectrofotometría (Take 3, Biotek; en una plataforma de lectura Cytation 5), donde se midió la absorbancia 260/280 nm en cada muestra para cuantificar ADN y proteínas, en duplicado.

### Ensayos moleculares

Se realizaron ensayos de PCR de las diferentes extracciones, montados en un laboratorio de pre PCR separado y habilitado especialmente para tal procedimiento. Para ello se utilizaron diferentes partidores, con tal de obtener un frag-

mento específico de dos genes ribosomales: 12S y 16S; además se incluyeron blancos de PCR correspondientes a los controles de filtración. En primer lugar a cada muestra se le realizó un ensayo de PCR con los partidores 12S MiFish-U (F 5'-GTCGGTAAACTCGTGCCAGC-3' y R 5'-CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG-3'), el que es específico para peces (Miya, et al. 2015). Con esta amplificación se buscó evaluar el éxito de amplificación y evaluar la presencia de peces en cada método de extracción y para todas las réplicas, incluyendo los controles.

En el caso del gen 16S, se realizó una PCR anidada utilizando primero los partidores 16S-F-new (5'- GCCTGCCCTGTGACTATGG -3') (Clusa, et al. 2017) y 16SBr (Palumbi, et al. 2002). A partir del producto PCR de este experimento, se realizó una segunda PCR con los partidores 16S-F-Salmo (5'- AAGACCTGTATGAATGGCATC -3') y 16S-R-Salmo (5'- TCGATAGGGACTCTGGGAGA -3') (Zaiko, et al. 2015) específicos para salmónidos. Se realizó un control interno en cada PCR para evitar falsos positivos dentro de los resultados. De acuerdo a nuestros análisis previos, la primera PCR amplifica para galáxidos nativos y salmónidos presentes en Chile, mientras que la segunda PCR sería específica para salmónidos (Clusa, et al. 2017). Con estos ensayos de amplificación se buscó evaluar la presencia de estos grupos de peces en las muestras de eDNA, incluyendo igualmente los controles.

En todos los ensayos se trabajó con Sapphire Amp Fast PCR Master Mix (Takara), y cada partidor a una concentración final de 200 nM. El protocolo de PCR fue el siguiente: 94°C por 1 min, seguido por 30 ciclos de 98°C por 5 seg, T°C por 5 seg y 72°C por 10 seg. La temperatura de alineamiento (T°C) dependió de las especificaciones de cada partidor. Cada experimento de amplificación fue chequeado en geles de agarosa al 1%.

## Análisis estadísticos

Se realizó un análisis de varianza de una vía para evaluar las diferencias entre la concentración de ADN obtenida mediante Qubit, Take 3 y para los índices 260/280; mientras que se realizó un test de Tukey a posteriori para evaluar especialmente las diferencias entre métodos de extracción de ADN y respecto a los controles por sitio. En el caso de los experimentos de PCR, se realizó un test de proporciones Chi cuadrado para evaluar la independencia del método de extracción de ADN respecto al éxito de amplificación. Todos los análisis y gráficos fueron realizados en el software R v 4.0.1.

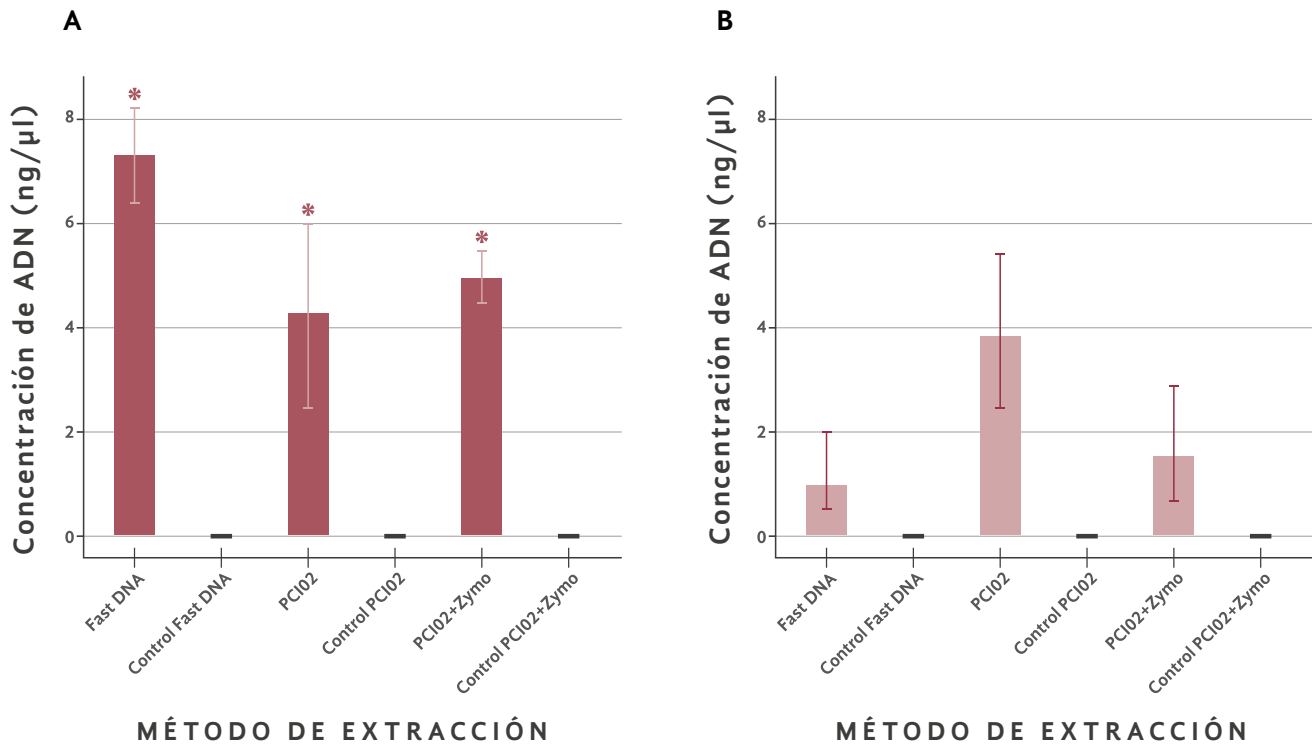
## RESULTADOS

Los resultados de extracción de ADN fueron dispares entre los dos sitios (Figura 4). En el río Maullín los promedios de concentración de ADN (ng/μl) de acuerdo a las mediciones realizadas por Qubit 2.0 fueron de 7.2 ( $\pm 2.2$  [ $\pm 1$  desviación estándar]), 4.23 ( $\pm 4.4$ ) y 4.9 ( $\pm 1.9$ ) para el kit Fast DNA, el método PCIo2 y el método PCIo2 + kit Zymo respectivamente, sin embargo, sólo hay diferencias significativas respecto a los controles ( $F_{5,18} = 4.295$ ,  $p = 0.009$ ), y no existieron diferencias para las concentraciones de ADN obtenidas entre los métodos. En el río Petrohué, por otro lado, los promedios de concentración de ADN (ng/μl) medidas por el mismo método fueron menores, con valores de 1.2 ( $\pm 1.9$ ) para el kit Fast DNA, 3.9 ( $\pm 4.0$ ) para el método PCIo2 y 1.6 ( $\pm 2.4$ ) para el método PCIo2 + kit Zymo, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas respecto a los controles ni entre los métodos de extracción ( $F_{5,18} = 1.304$ ,  $p = 0.306$ ).

En el caso de las concentraciones de ADN medidas por espectrofotometría mediante Take3 (Tabla 1), en general los promedios son mayores a los reportados por Qubit, y existen diferen-

cias entre los valores medidos para el río Maullín ( $F_{5,42} = 12.06$ ,  $p > 0.001$ ) y para el río Petrohué ( $F_{5,42} = 7.474$ ,  $p > 0.001$ ). En el río Maullín, se observaron diferencias a posteriori para las comparaciones Fast DNA vs PCIo2 y PCIo2 vs PCIo2 + kit Zymo, pero no para el método Fast DNA vs PCIo2 + kit Zymo, mientras que para el río Petrohué, sólo se observaron diferencias

entre el método PCIo2 vs PCIo2 + kit Zymo. Respecto a los valores del índice 260/280 para el río Maullín ( $F_{5,42} = 7.757$ ,  $p > 0.001$ ), no existieron diferencias a posteriori entre los métodos, sin embargo, para el río Petrohué ( $F_{5,42} = 4.129$ ,  $p = 0.004$ ) se apreciaron diferencias a posteriori entre el método Fast DNA vs PCIo2 + kit Zymo.



**Figura 4:** Concentración de ADN en ng/μl según método de extracción utilizando Qubit 2.0. Las barras indican los promedios; los intervalos indican error estándar; los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control. A, Río Maullín. B, Río Petrohué.



Sitio	Método	Take 3		260/280		
		Promedio (ng/μl)	Desviación estándar	mínimo	máximo	promedio
Río Maullín	Fast DNA	42.74	10.33	1.64	2.28	1.81
Río Maullín	Control Fast DNA	15.85	4.16	1.45	1.73	1.63
Río Maullín	PClo2	214.95	144.12	1.45	1.64	1.54
Río Maullín	Control PClo2	0.5	1.02	-1.21	1.4	0.22
Río Maullín	PClo2 + Zymo	27.36	10.97	1.55	1.94	1.72
Río Maullín	Control PClo2 + Zymo	2.73	1.5	1.8	9.95	4.63
Río Petrohué	Fast DNA	27.77	7.31	1.47	2.02	1.71
Río Petrohué	Control Fast DNA	28.25	12.68	1.82	1.9	1.86
Río Petrohué	PClo2	45.18	33.58	1.7	2.03	1.85
Río Petrohué	Control PClo2	2.59	1.45	1.56	1.83	1.7
Río Petrohué	PClo2 + Zymo	7.62	7.66	1.75	6.28	2.89
Río Petrohué	Control PClo2 + Zymo	1.91	0.32	1.71	6.11	3.49

**Tabla 1:** Mediciones de concentración y calidad de ADN según método espectrofotométrico, por sitio de estudio y método de extracción de ADN.

Al analizar el éxito de amplificación con los partidores 12S MiFish, 16S NewF y 16S Salmo (Tabla 2), se observó que todos los controles evidenciaron ausencia de amplificación positiva, tanto para las PCR iniciales (12S y 16S NewF), como para las PCR anidadas (16S Salmo). Respecto a la detección de peces mediante los partidores MiFish 12S y al éxito de amplificación para los partidores 12S MiFish, para el río Maullín se observaron diferencias respecto al método, donde 4 de 6 réplicas amplificaron para el kit

Fast DNA, mientras que 0 de 6 réplicas lo hicieron para el método PClo2, y 2 de 6 réplicas amplificaron al utilizar el kit Zymo + el método PClo2; observando dependencia del método de extracción respecto al éxito de amplificación marginalmente significativo ( $\chi^2 = 6$ ,  $p = 0.05$ ). En el río Petrohué, en tanto, también hubieron diferencias, el kit Fast DNA amplificó 6 de 6 réplicas, el método PClo2 amplificó 5 de 6 réplicas, mientras que la limpieza con el kit Zymo + el método PClo2 sólo gene-

ró 2 de 6 bandeos positivos, existiendo igualmente dependencia del método de extracción respecto al éxito de amplificación (Chi cuadrado<sub>2</sub> = 7.2, p = 0.027).

La detección de salmónidos y galáxidos con los partidores 16S-F-new y 16S-F-Salmo también mostraron diferencias (Tabla 2). En el caso del río Maullín y para la primera PCR se observaron 4 de 6 réplicas positivas para el kit Fast DNA, mientras que el método PCIo<sub>2</sub> no tuvo amplificaciones positivas, y al utilizar el kit Zymo + el método PCIo<sub>2</sub> hubieron 3 de 6 amplificaciones positivas;

en este caso se observó dependencia del éxito de amplificación respecto al método de extracción de ADN (Chi cuadrado<sub>2</sub> = 6.078, p = 0.048). Al analizar la segunda PCR, el kit Fast DNA mostró 3 de 6 amplificaciones positivas, y tanto el método PCIo<sub>2</sub> y al utilizar el kit Zymo las amplificaciones positivas aumentaron (Chi cuadrado<sub>2</sub> = 3.88, p = 0.14). Finalmente, para el río Petrohué las amplificaciones en la primera PCR fueron casi 100 % exitosas para los tres métodos (Chi cuadrado<sub>2</sub> = 1.125, p = 0.57), aunque sólo el método PCIo<sub>2</sub> mantuvo el éxito de amplificación en la segunda PCR (Chi cuadrado<sub>2</sub> = 5.85, p = 0.054).

Sitio	Método	12S MiFish	16S NewF	16S Salmo
Río Maullín	Fast DNA	4/6*	4/6*	3/6
Río Maullín	Control Fast DNA	0/2	0/2	0/2
Río Maullín	PCIo <sub>2</sub>	0/6*	0/6*	4/6
Río Maullín	Control PCIo <sub>2</sub>	0/2	0/2	0/2
Río Maullín	PCIo <sub>2</sub> + Zymo	2/6*	3/6*	6/6
Río Maullín	Control PCIo <sub>2</sub> + Zymo	0/2	0/2	0/2
Río Petrohué	Fast DNA	6/6*	5/6	1/6
Río Petrohué	Control Fast DNA	0/2	0/2	0/2
Río Petrohué	PCIo <sub>2</sub>	5/6*	5/6	5/6
Río Petrohué	Control PCIo <sub>2</sub>	0/2	0/2	0/2
Río Petrohué	PCIo <sub>2</sub> + Zymo	2/6*	6/6	2/6
Río Petrohué	Control PCIo <sub>2</sub> + Zymo	0/2	0/2	0/2

**Tabla 2:** Éxito de amplificación según sitio de muestreo, método de extracción de ADN y partidores utilizados.

\*Indican diferencias significativa entre las proporciones.

## DISCUSIÓN

Los altos costos de conservación (i.e. el costo alternativo de reemplazar una actividad antrópica actual o futura por proteger la biodiversidad) a lo largo del país, otorgan escasas posibilidades para aplicar alguna estrategia de conservación (Jorquera-Jaramillo, et al. 2012). Sin embargo, los análisis basados en eDNA pueden otorgarnos información más completa y acabada sobre el estado del ecosistema a través de las diferentes técnicas moleculares, posicionándose como una herramienta útil para monitorear la composición de especies y su distribución muy rápidamente, entregando información sobre los cambios en la biodiversidad o alteración del funcionamiento de los ecosistemas (Cristecu y Hebert, 2018). En el presente trabajo se analizó la concentración del ADN extraído y cuantificado por dos métodos diferentes y su posterior análisis, provenientes de dos ríos físicamente diferentes. El río Petrohué se caracteriza por tener sectores angostos y algunos sectores turbulentos con presencia de rápidos, siendo sus aguas por lo general prístinas (DGA, 2009); por otro lado, el río Maullín tiene un cauce en promedio más ancho y profundo, y sus aguas al ser provenientes del Lago Llanquihue, presentan probablemente un mayor grado de trofía producto de la intervención antropogénica en este sector (DGA, 2004). Considerando las características ambientales de cada sitio de muestreo, los resultados indican diferencias en la concentración de ADN, independiente del método de cuantificación (Figura 4; Tabla 1), lo cual podría estar ligado al transporte del ADN y aglomeración de este producido principalmente en ríos turbulentos (Barnes y Turner, 2016; Antognazza, et al. 2019) y a la presencia de material particulado asociado a aguas con alta carga orgánica y presencia de inhibidores, siendo necesario aplicar métodos de purificación de

ADN, los cuales pueden disminuir la concentración de ADN final (Hunter et al. 2019), como se puede observar al comparar las concentraciones obtenidas por PCIo2 y PCIo2 + Zymo (Tabla 1). Además, las diferencias en los valores de concentración de ADN por Take 3 y Qubit 2.0 se deben principalmente a la especificidad de la técnica fluorimétrica, en donde la tinción se une específicamente al ADN de doble hebra (Ponti, et al. 2018), en cambio, la espectrometría al medir a una absorbancia a diferentes longitudes de onda, también puede estar cuantificando proteínas, ARN y otros compuestos, lo que nos permite saber la calidad del ADN (Ponti, et al. 2018). En este sentido, los valores del índice A260/280, de las muestras provenientes de los ríos Petrohué y Maullín presentaron en su mayoría una calidad de ADN óptima (entre 1.6–2.0) (Wasko, et al. 2003) a excepción del método de extracción PCIo2 + Zymo que en el caso del río Petrohué puede estar presentando contaminación por presencia de ARN (Loughrey y Marlock, 2017); mientras que el método PCIo2 en el río Maullín por contaminación de compuestos aromáticos como el fenol (Koetsier y Cantor, 2019). Por otro lado, los resultados de PCR fueron variados de acuerdo al método de extracción y al partidador utilizado (Tabla 2), destacando el valor del trabajo de variadas réplicas en terreno para sustentar los resultados, sobre todo en una fase experimental (Hunter, et al. 2019). Destaca la importancia de la cantidad de réplicas y controles internos (e.g. de filtración y extracción de ADN) durante el desarrollo de los experimentos, esto con el fin de disminuir la probabilidad de falsos negativos y asegurar una correcta interpretación de los resultados sobre la biodiversidad presente al momento de tomar decisión sobre conservación. Finalmente, resulta de extrema importan-

cia optimizar los métodos iniciales en el flujo de trabajo del eDNA y determinar, por ejemplo, el efecto del material filtrante, tamaño de poro y método de extracción (Deiner, et al. 2018).

## CONCLUSIONES

Chile posee 1.251 ríos con particularidades únicas (DGA, 2016), donde podemos encontrar en zonas cordilleranas ríos con alto contenido mineral, tramos de pH extremadamente ácidos y presencia de metales pesados, y en otras zonas del país, encontrar ríos con baja conductividad y productividad (DGA, 2016; MMA, 2019). Así técnicas ampliamente estudiadas a nivel mundial como el análisis del eDNA hacen necesaria su previa experimentación y estandarización en las diferentes ecoregiones de nuestro país, siendo fundamental la elección de un apropiado método de filtración, extracción y análisis, según las características bióticas y abióticas que presente el sitio de estudio, en la que Chile cuenta con un amplio espectro de aplicabilidad para el uso de técnicas moleculares basada en eDNA. En perspectiva de investigación y desarrollo es deseable una mayor implementación de técnicas novedosas, considerando las metas que se han propuesto a nivel país, en cuanto a la preservación y conservación de la diversidad biológica en el contexto actual de cambio climático (MMA, 2017). En este sentido para ir avanzando en nuevas políticas de manejo se necesitará de la actualización de bases de datos de relevancia (e. g. distribución de especies que estén en el reglamento de clasificación de las especies (RCE), así como también de especies invasoras), y la implementación de nuevos protocolos de monitoreos, tomando el uso de eDNA como una alternativa atractiva y factible para realizar en complemento con metodologías tradicionales de muestreo.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos especiales al Núcleo Milenio INVASAL, Concepción, y al proyecto Fondecyt iniciación N° 11181259 por el apoyo financiero y logístico. Los resultados fueron desarrollados por Franco Erazo Aguilera, Biólogo Marino de la Universidad de Valparaíso a quien agradecemos ceder parte de los resultados de su trabajo de titulación.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abell, R., Thieme, M. L., Revenga, C. et al. (2008). Freshwater ecoregions of the world: a new map of biogeographic units for freshwater biodiversity conservation. *BioScience*, 58(5), 403-414.
- Adams, C. I., Knapp, M., Gemmell, N. J. et al. (2019). Beyond biodiversity: can environmental DNA (eDNA) cut it as a population genetics tool?. *Genes*, 10(3), 192.
- Antognazza, C. M., Britton, J. R., Potter, C. et al. (2019). Environmental DNA as a non-invasive sampling tool to detect the spawning distribution of European anadromous shads (*Alosa* spp.). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 29(1), 148-152.
- Arismendi, I., B. E. Penaluna, J. B. Dunham, C. et al. (2014). Differential invasion success of salmonids in southern Chile: Patterns and hypotheses. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 24:919-941.
- Baker, C. S., Steel, D., Nieukirk, S., & Klinck, H. (2018). Environmental DNA (eDNA) from the wake of the whales: droplet digital PCR for detection and species identification. *Frontiers in Marine Science*, 5, 133.
- Bálint, M., Pfenninger, M., Grossart, H. P. et al. (2018). Environmental DNA time series in ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, 33(12), 945-957.
- Barnes, M. A., & Turner, C. R. (2016). The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 17(1), 1-17.
- Bista, I., Carvalho, G. R., Walsh, K. et al. (2017). Annual time-series analysis of aqueous eDNA reveals ecologically relevant dynamics of lake ecosystem biodiversity. *Nature communications*, 8(1), 1-11.
- Butchart, S. H., Walpole, M., Collen, B. et al. (2010). Global biodiversity: indicators of recent declines. *Science*, 328(5982), 1164-1168.
- Caley, M. J., Fisher, R., & Mengersen, K. (2014). Global species richness estimates have not converged. *Trends in Ecology & Evolution*, 29(4), 187-188. doi:10.1016/j.tree.2014.02.002
- Cilleros, K., Valentini, A., Allard, L. et al. (2019). Unlocking biodiversity and conservation studies in high-diversity environments using environmental DNA (eDNA): A test with Guianese freshwater fishes. *Molecular ecology resources*, 19(1), 27-46.
- Clusa, L., Ardura, A., Fernández, S. et al. (2017). An extremely sensitive nested PCR-RFLP mitochondrial marker for detection and identification of salmonids in eDNA from water samples. *PeerJ*, 5, e3045.
- Cristecu, M. E., & Hebert, P. D. (2018). Uses and misuses of environmental DNA in biodiversity science and conservation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 49, 209-230. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110617-062306>
- DGA, Dirección General de Aguas (2004). Diagnóstico y clasificación de los cursos y cuerpos de agua según objetivo de calidad. Cuenca del Río Maullín. Ejecutado por Cade-Idepe Consultores en Ingeniería. Ministerio de Obras Públicas.
- DGA, Dirección General de Aguas (2009). Informe técnico N° 4: Reserva del Río Petrohué para la conservación ambiental y el desarrollo local de la cuenca. Ministerio de Obras Públicas.
- DGA, Dirección General de Aguas (2016). Atlas del Agua. Chile 2016. Ministerio de Obras Públicas.
- Deiner, K., Lopez J., Bourne S. et al. (2018). Optimising the detection of marine taxonomic richness

- using environmental DNA metabarcoding: the effects of filter material, pore size and extraction method. *Metabarcoding and Metagenomics*, 2, e28963.
- Dougherty, M. M., Larson, E. R., Renshaw, M. A. et al. (2016). Environmental DNA (eDNA) detects the invasive rusty crayfish *Orconectes rusticus* at low abundances. *Journal of Applied Ecology*, 53(3), 722-732.
- Elbrecht, V., & Leese, F. (2017). Validation and development of COI metabarcoding primers for freshwater macroinvertebrate bioassessment. *Frontiers in Environmental Science*, 5, 11.
- Elosegui, A & Sabater, S. (2009). Conceptos y técnicas en ecología fluvial. Barcelona (España):Fundación BBVA.
- Evans, N. T., Olds, B. P., Renshaw, M. A. et al. (2016). Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding. *Molecular ecology resources*, 16(1), 29-41.
- Ficetola, G. F., Poulénard, J., Sabatier, P. et al. (2018). DNA from lake sediments reveals long-term ecosystem changes after a biological invasion. *Science Advances*, 4(5), eaar4292.
- Figueroa, R., Palma, A., Ruíz, V. et al. (2007). Análisis comparativo de índices bióticos utilizados en la evaluación de la calidad de las aguas en un río mediterráneo de Chile: río Chillán, VIII Región. *Revista chilena de historia natural*, 80(2), 225-242.
- Figueroa, A. (2018). Humedales de Chile: Diversidad, endemismo y desafíos para su conservación. *Biodiversidad de Chile: Patrimonio y desafíos*. Tomo 2. Ministerio del Medio Ambiente, Santiago, Chile. 76-83.
- Gligo, V. (2016). Informe país estado del medio ambiente en Chile. Comparación 1999-2015.
- Gligo, V. (2019). Informe país estado del medio ambiente en Chile 2018.
- Habit, E., Górski k., Alò D. et al. (2019). Biodiversidad de Ecosistemas de Agua Dulce. Mesa Biodiversidad-Comité Científico COP25; Ministerio de Ciencia, Tecnología, Conocimiento e Innovación. 64 páginas. Biodiversidad de ecosistemas de agua dulce.
- Hansen, B. K., Jacobsen, M. W., Middelboe, A. L. et al. (2020). Remote, autonomous real-time monitoring of environmental DNA from commercial fish. *Scientific reports*, 10(1), 1-8.
- Harrison, J. B., Sunday, J. M., & Rogers, S. M. (2019). Predicting the fate of eDNA in the environment and implications for studying biodiversity. *Proceedings of the Royal Society B*, 286(1915), 20191409.
- Harper, L. R., Lawson Handley, L., Hahn, C. et al. (2018). Needle in a haystack? A comparison of eDNA metabarcoding and targeted qPCR for detection of the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Ecology and evolution*, 8(12), 6330-6341.
- Hering, D., Borja, A., Jones, J. I. et al. (2018). Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European Water Framework Directive. *Water Research*, 138, 192-205.
- Hunter, M. E., Ferrante, J. A., Meigs-Friend, G. et al. (2019). Improving eDNA yield and inhibitor reduction through increased water volumes and multi-filter isolation techniques. *Scientific Reports*, 9(1), 1-9.
- Igawa, T., Takahara, T., Lau, Q. et al. (2019). An application of PCR-RFLP species identification assay for environmental DNA detection. *PeerJ*, 7, e7597.
- Itakura, H., Wakiya, R., Yamamoto, S. et al. (2019). Environmental DNA analysis reveals the spa-

- tial distribution, abundance, and biomass of Japanese eels at the river-basin scale. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 29(3), 361-373.
- Johnson, C. N., Balmford, A., Brook, B. W. et al. (2017). Biodiversity losses and conservation responses in the Anthropocene. *Science*, 356(6335), 270-275. doi:10.1126/science.aam9317
- Jorquera-Jaramillo, C., Vega, J. A., Aburto, J. et al. (2012). Conservación de la biodiversidad en Chile: Nuevos desafíos y oportunidades en ecosistemas terrestres y marinos costeros. *Revista chilena de historia natural*, 85(3), 267-280.
- Koetsier, G., & Cantor, E. (2019). *A Practicle Guide to Analysing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometer*. New England Biolabs Inc.
- Longmire J., MaltbieM., & Baker R. (1997). Use of "lysis buffer" in DNA isolation and its implications for museum collections. *Museum of Texas Tech University* 163: 1-3.
- Loughrey, S., & Matlock, B. (2017). Acclaro protein contaminant ID. *DNA*, 1(2.0), 1-8.
- Luebert, F., & Pliscoff, P. (2017). *Sinopsis bioclimática y vegetacional de Chile (2a edición)*. Editorial universitaria, Santiago, Chile.
- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T. et al. (2015). MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society open science*, 2(7), 150088.
- MMA, Ministerio del Medio Ambiente (2014). *Quinto Informe de Estado del Medio Ambiente 2016*. Santiago de Chile. Disponible en: [https://mma.gob.cl/wp-content/uploads/2017/08/Libro\\_Convenio\\_sobre\\_diversidad\\_Biologica.pdf](https://mma.gob.cl/wp-content/uploads/2017/08/Libro_Convenio_sobre_diversidad_Biologica.pdf)
- MMA, Ministerio del Medio Ambiente (2016). *Informe de Estado del Medio Ambiente 2016*. Santiago de Chile. 557 p. Disponible en: <http://sinia.mma.gob.cl/wp-content/uploads/2017/08/IEMA2016.pdf>
- MMA, Ministerio del Medio Ambiente (2017). *Estrategia nacional de biodiversidad 2017-2030*. Ministerio del Medio Ambiente, Santiago.
- MMA, Ministerio del Medio Ambiente (2018). *Biodiversidad de Chile. Patrimonio y Desafíos. Tercera edición. Tomo I*. pp. Santiago de Chile.
- MMA, Ministerio del Medio Ambiente (2019). *Sexto Informe Nacional de Biodiversidad de Chile: elaborado en el marco del Convenio sobre la Diversidad Biológica*. Santiago: Ministerio del Medio Ambiente.
- Mouillet, C., Barta, B., Espinosa, R. et al. (2018). Ecological effects of introduced rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in pristine Ecuadorian high Andean lakes. *Fundamental and Applied Limnology/Archiv für Hydrobiologie*, 191(4), 323-337.
- Nester, G. M., De Brauwer, M., Koziol, A. et al. (2020). Development and evaluation of fish eDNA metabarcoding assays facilitate the detection of cryptic seahorse taxa (family: Syngnathidae). *Environmental DNA*.
- Olajos, F., Bokma, F., Bartels, P. et al. (2018). Estimating species colonization dates using DNA in lake sediment. *Methods in Ecology and Evolution*, 9(3), 535-543.
- Parducci, L., Bennett, K. D., Ficetola, G. F. et al. (2017). Ancient plant DNA in lake sediments. *New Phytologist*, 214(3), 924-942.

- Pawlowski, J., Kelly-Quinn, M., Altermatt, F. et al. (2018). The future of biotic indices in the ecogenomic era: Integrating (e) DNA metabarcoding in biological assessment of aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment*, 637, 1295-1310.
- Palumbi, S. R., Martin, A., Romano, S. et al. (2002). *The simple fool's guide to PCR, version 2.0*. University of Hawaii, Honolulu, 45.
- Peredo-Parada, M., Martínez-Capel, F., Garófano-Gomez, V. et al. (2009). Base de datos Ecohidrológica de los ríos de Chile: Una herramienta de gestión para los ecosistemas acuáticos. *Gayana (Concepción)*, 73(1), 119-129.
- Pérez-Quezada, J., & Rodrigo, P. (2018). Metodologías aplicadas para la conservación de la biodiversidad en Chile.
- Petersen, J. E., Kennedy, V. S., Dennison, W. C. et al. (2009). Enclosed experimental ecosystems and scale. In *Tools for Understanding and Managing Coastal Ecosystems*. Springer New York.
- Ponti, G., Maccaferri, M., Manfredini, M., Kaleci, S. et al. (2018). The value of fluorimetry (Qubit) and spectrophotometry (NanoDrop) in the quantification of cell-free DNA (cfDNA) in malignant melanoma and prostate cancer patients. *Clinica Chimica Acta*, 479, 14-19.
- Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J. et al. (2014). The detection of aquatic animal species using environmental DNA—a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology*, 51(5), 1450-1459.
- Reid, B., Astorga, A., & Madriz, I. (2019). Estado de conocimiento y conservación de la biodiversidad de los ecosistemas dulceacuícolas de la Patagonia.
- Shapiro, B., & Hofreiter, M. (2013). Ancient DNA. *The Princeton Guide to Evolution*, 475-481.
- Stat, M., John, J., DiBattista, J. D. et al. (2019). Combined use of eDNA metabarcoding and video surveillance for the assessment of fish biodiversity. *Conservation Biology*, 33(1), 196-205.
- Vila, I., Veloso, A., Schlatter & Ramírez, C. (2006). *Macrófitas y vertebrados de los sistemas límnicos de Chile*. Editorial Universitaria.
- Vila & Quezada-Romegialli (2018). *Peces Límnicos. Biodiversidad de Chile: Patrimonio y desafíos*. Tomo 1. Ministerio del Medio Ambiente, Santiago, Chile. 173-181.
- Wasko, A. P., Martins, C., Oliveira, C., & Foresti, F. (2003). Non-destructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. *Hereditas*, 138(3), 161-165.
- Zaiko, A., Martinez, J. L., Ardura, A. et al (2015). Detecting nuisance species using NGST: methodology shortcomings and possible application in ballast water monitoring. *Marine Environmental Research*, 112, 64-72.



